

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un procedeu de obținere a unui preparat enzimatic cu activitate β -glucozidazică.

Preparatul enzimatic hidrolitic obținut din tulpina de micromicete *Aspergillus niger* CNMN-FD-10 conține în calitate de componentă de bază enzima β -glucozidaza cu activitate înaltă de scindare a legăturii β -glucozidice din aril β -D-glucozide și din dizaharide, în principal, din celobioză, și poate fi utilizat în oenologie, pentru amplificarea aromei de soi a vinurilor de calitate, de asemenea în industriile eterooleaginoasă, farmaceutică, cosmetică, de fabricare a sucurilor, alte ramuri industriale, pentru eliberarea substanțelor aromatice care se găsesc în materia primă vegetală (struguri, pomușoare, biomasă de planter eterooleaginoase, sucuri etc.) în stare legată în formă de glucozide.

Conținutul redus al componentelor enzimaticelor satelite (celobiohidrolaze, endoglucanaze, xilanaze) nu diminuează valoarea practică a preparatului, astfel asigură hidroliza polizaharidelor structurale ale peretelui celular al materiei vegetale, contribuind la creșterea randamentului produsului final, favorizând activitatea β -glucozidazelor.

Se știe că tulpinile de micromicete din genurile *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* sunt principalii producători de hidrolaze exocelulare, inclusiv celuloze și xilanaze, la nivel industrial.

De asemenea este bine cunoscut că nu toate microorganismele producătoare de enzime celulozolitice au capacitatea de a produce și β -glucozidaze – componentă a complexului celulozic, spre exemplu unele tulpini din genul *Trichoderma* – cunoscute ca producătoare de celuloze, fapt ce diminuează valoarea lor industrială [1].

La numărul producătorilor activi de β -glucozidaze pot fi raportate speciile genului *Aspergillus*, în particular tulpina *Aspergillus niger* CNMN-FD-10, procedeul care prevede cultivarea submersă pe un mediu cu următoarea compoziție (g/L): borhot de sfeclă – 20, tărâțe de grâu – 20, NaNO_3 – 2,5, KH_2PO_4 – 1,0, KCl – 0,1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3, apă până la 1L, pH-ul inițial 6,0, durata cultivării de 8 zile, și sedimentarea complexului enzimatic în condiții clasice (pH-ul nativ al lichidului cultural 7,5...8,0 și raportul V/V a lichidului cultural : alcool etilic (LC:AE) 1:4, asigură obținerea preparatului enzimatic ce conține 4 componente: celobiohidrolaze – 12...15 u/g; endoglucanaze – 450...480 u/g, xilanaze – 2800...3200 u/g, β -glucozidaze – 240...270 u/g [2].

Dezavantajul celei mai apropiate soluții constă în faptul că în condițiile marcate tulpina nu realizează la maximum capacitatea de biosinteză a β -glucozidazelor.

Problema pe care o soluționează invenția constă în crearea condițiilor pentru intensificarea bioseintzei β -glucozidazelor la tulpina *Aspergillus niger* CNMN FD 10 prin elaborarea a noi regimuri de cultivare dirijată și selectarea condițiilor favorabile de sedimentare a complexului enzimatic din lichidul cultural, orientate spre păstrarea nivelului înalt al activității β -glucozidazelor.

Procedeul de obținere a unui preparat enzimatic cu activitate β -glucozidazică prevede însămânțarea suspensiei de spori de $(2,5...3,0) \times (10^6...10^7)$ spori/mL ai tulpinii *Aspergillus niger* CNMN-FD-10 în cantitate de 5,0% vol. pe un mediu de cultură cu următorul raport al componentelor, g/L: borhot de sfeclă – 25,0, tărâțe de grâu – 20,0, NaNO_3 – 3,0, KH_2PO_4 – 1,0, KCl – 0,1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3 și apă până la 1,0 L, la un pH 5,5...6,0 și cultivarea submersă la temperatura de 28...30 °C cu agitare continuă, în decurs de 7 zile, apoi lichidul de cultură se separă de biomasă, se acidulează până la valoarea pH 3,0, se tratează cu alcool etilic rectificat răcit până la temperatura de -10...-12°C, în raport de respectiv 1:2, după care se separă preparatul enzimatic prin centrifugare.

Rezultatul constă în obținerea preparatului enzimatic parțial purificat, cu nivel înalt al activității β -glucozidazelor, mai puțin de 1525 u/g, ce depășește de 5,6...6,3 ori nivelul din cea mai apropiată soluție și în cantități reduse a restului componentelor complexului enzimatic: celobiohidrolaze – 4,1 u/g, endoglucanaze – 64,0 u/g, xilanaze – 1022 u/g, destinat utilizării în oenologie, pentru amplificarea aromei de soi a vinurilor de calitate, în industriile eterooleaginoasă, farmaceutică, cosmetică, de fabricare a sucurilor.

Rezultatul se datorează faptului că procedeul se efectuează în două etape, și anume:

I. Cultivarea submersă în sistem discontinuu a tulpinii de micromicete *Aspergillus niger* CNMN-FD-10 timp de 7 zile, în condiții de agitare continuă la temperatura de 28...30°C, pe mediul selectat cu următoarea compoziție (g/L): borhot de cfeclă – 25,0, tărâțe de grâu – 20, NaNO_3 – 3,0, și restul sărurilor minerale în raport nemodificat – KH_2PO_4 – 1,0, KCl – 0,1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3, apă până la 1L, cu pH-ul inițial de 5,5...6,0.

II. Separarea preparatului enzimatic de lichidul cultural al producătorului prin sedimentare cu alcool etilic care include acțiunile:

- filtrare mecanică și centrifugare a lichidului cultural de biomasă;
- acidifierea filtratului de lichid cultural până la pH-ul 3,0;
- sedimentarea complexului enzimatic din lichidul cultural al producătorului cu alcool etilic de 96°, preventiv răcit (-10... -12° C) la raportul LC:AE 1:2;

Avantajele procedurii:

- Activitatea β -glucozidazelor înaltă datorită condițiilor special selectate de cultivare a producătorului și de sedimentare din lichidul cultural ce depășește cea mai apropiată soluție de 5,6...6,3 ori.
- Reducerea duratei de cultivare cu 24 ore.
- Reducerea volumului de etanol de 2 ori la recuperarea complexului enzimatic din filtratul de cultură.

Exemplul 1

I. Tulpina de micromicete *Aspergillus niger* CNMN-FD-10 se cultivă pe mediul optimizat, cu următoarea compoziție (g/L): borhot de cfeclă – 25,0, tărâțe de grâu – 20,0, NaNO₃ – 3,0, KH₂PO₄ – 1,0, KCl – 0,1, CaCl₂ · 2H₂O – 0,1, MgSO₄ · 7H₂O – 0,3 și apă până la 1L cu pH inițial 5,5. Mediul se repartizează câte 0,2 L în vase Erlenmayer cu capacitatea de 1L și după sterilizare prin autoclavare la 120°C, timp de 1 oră, și răcire până la 30°C se inoculează cu 5 % v/v de suspensie de spori (2,5...3,0 x10⁶...10⁷ spori/ml) a culturii de 10...12 zile crescută pe suprafețe înclinate de malț-agar. Retortele se montează pe un agitator cu viteza de rotație de 200 rot./min. Cultivarea se realizează în încăpere cu termostatare la temperatura de 30°C, timp de 168 ore.

II. După cultivare lichidul cultural se separă de biomasă prin filtrare mecanică sau centrifugare. Complexul enzimatic se separă din filtratul de cultură prealabil acididulat până la pH-ul 3,0 prin sedimentare cu alcool etilic rectificat luate în raportul LC:AE de 1:2, și centrifugare la 6000 rot./min, timp de 10 min. Ulterior în preparatul obținut se determină activitățile enzimatic: β-glucozidazică, celobiohidrolazică, endoglucanazică și xilanazică, după acțiunea asupra substraturilor specifice, respectiv – n-nitrofenil-β-D-glucopiranozid, hârtie de filtru, N-carboximetilceluloză, și dozarea zaharurilor reducătoare, prin metoda Somogy-Nelson. În condițiile marcate aceste activități constituie (u/g): β-glucozidazică – 1545, celobiohidrolazică – 4,05, endoglucanazică – 63,8 și xilanazică – 1020.

Exemplul 2

Se repetă procedura ca în exemplul 1. Mediul nutritiv și temperatura cultivării se modifică după cum urmează:

I. Tulpina de micromicete *Aspergillus niger* CNMN-FD-10 se cultivă pe mediul cu următoarea compoziție (g/L): borhot de cfeclă – 25,0, tărâțe de grâu – 20,0, NaNO₃ – 3,0, KH₂PO₄ – 1,0, KCl – 0,1, CaCl₂ · 2H₂O – 0,1, MgSO₄ · 7H₂O – 0,3 și apă până la 1L, la un pH inițial de 6,0.

Cultivarea se efectuează în vase Erlenmayer cu capacitatea de 1 L câte 0,2 L mediu, pe un agitator cu viteza de rotație 200 rot/min, în termostate la temperatura de 28°C, timp de 168 ore, în rest condițiile sunt identice ca în ex.1.

II. Condițiile de recuperare a complexului enzimatic din filtratul de cultură sunt identice celor din ex.1: ajustarea prealabilă a pH-lui la valoarea 3,0; raportul LC:AE 1:2.

Preparatul enzimatic obținut prezintă următoarele activități (u/g): β-glucozidazică – 1528, celobiohidrolazică – 4,07, endoglucanazică – 62,7, xilanazică – 1018.